

316L型含铜不锈钢与2种临床用输尿管支架 表面结石形成对比研究

李建中¹ 赵静² 李昕¹ 杨柯² 张华洋¹ 王振宇¹

[摘要] 目的:探讨316L型含铜不锈钢与临床用输尿管支架表面结石形成情况以及抑制结石形成作用机制。方法:加工直径1.8 mm,壁厚0.1 mm,长度10 mm的316L型含铜不锈钢薄壁管材,与对照组临床用输尿管支架均浸泡于人工尿液中,每天换液,进行无机盐沉积实验。分别沉积1、2、3个月,取出样品,采用扫描电镜、X射线光电子能谱对材料表面沉积盐进行分析。同时,采用电感耦合等离子体质谱仪测定316L型含铜不锈钢管材浸泡初期向人工尿液中溶出的铜离子量。此外,将不同样品分别与大肠杆菌和金黄色葡萄球菌悬液共培养,24 h后采用平板法测定材料杀菌率。结果:在不同浸泡时间,316L型含铜不锈钢表面沉积的结石量及结石尺寸均明显低于临床用输尿管支架材料;316L型含铜不锈钢每日铜离子溶出量为8.5 μg/L,且其对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的杀菌率分别达到95.5%和91.0%。结论:316L型含铜不锈钢有望成为一种具有一定抑制结石形成功能的输尿管支架材料。

[关键词] 含铜不锈钢;输尿管支架;结石

doi:10.13201/j.issn.1001-1420.2020.08.008

[中图分类号] R691.4 **[文献标志码]** A

Comparative study on encrustation formation between 316L Cu-bearing stainless steel and two kinds of clinical ureteral stents

LI Jianzhong¹ ZHAO Jing² LI Xin¹ YANG Ke² ZHANG Huayang¹ WANG Zhenyu¹

(¹Department of Urology, General Hospital of Northern Theater Command, Shenyang, 110840, China; ²Institute of Metal Research, Chinese Academy of Sciences)

Corresponding author: ZHAO Jing, E-mail: zhaojing@imr.ac.cn

Abstract Objective: To investigate the crystal deposition on the surface of Cu-bearing stainless steel (316L-Cu SS) and ureteral stents in clinic, respectively, and to further infer mechanism of inhibiting encrustation. **Method:** We prepared 316L-Cu SS tubes with 1.8 mm in diameter, 0.1 mm wall thickness and 10 mm in length. These tubes and ureteral stents, which were common in clinic, were all immersed in the artificial urine and changed daily. Crystal deposition tests were performed and SEM, XPS were used to analyze the composition, ICP-MS was used to measure the content of Cu ions released in initial period. Furthermore, the antibacterial rates against *E. coli* and *S. aureus* were examined with plating after being incubated for 24h. **Result:** The immersion tests showed that less crystals were deposited on the surface of 316L-Cu SS tube compared to the ureteral stents in clinic. Furthermore, the average content of copper ions released from 316L-Cu SS was 8.5 μg/L, and the anti-bacterial rates against *E. coli* and *S. aureus* were 95.5% and 91.0%, respectively. **Conclusion:** It was indicated that 316L-Cu SS would be taken as a novel candidate ureteral stent material with the property of reducing encrustation formation.

Key words Cu-bearing stainless steel; ureteral stent; encrustation

尿路感染和形成结石是植入输尿管支架后最为常见的两种并发症。在欧洲,每年治疗这两种并发症的花费高达10亿英镑^[1]。支架植入人体后,每6~12周更换1次,否则支架内、外表面不断附着尿液中析出的晶体,形成结石,从而堵塞输尿管支架,造成引流失败^[2]。目前临床中广泛使用的高分子输尿管支架由于结石引起的植入失败极为普遍^[3-4]。对于任意一种输尿管支架,形成结石的最初步骤均为细菌增殖。可替换植入支架表面上的

细菌增殖率超过70%,而永久性植入支架表面上的细菌增殖率高达100%。更重要的是,抗生素药物对抑制此类细菌增殖无明显作用^[5]。因此,如何从支架材料抑制感染这一角度出发,从而减少结石形成是输尿管支架研究的重要方向。

含铜不锈钢是一种新型的医用植入材料,是在目前临床应用的医用不锈钢的成分基础上,通过添加一定适量过饱和铜元素,使其在人体环境中持续释放微量的铜离子,赋予材料强烈、广谱和持久的生物功能^[6]。同时,通过调控铜元素的含量,使其在保证有效抗菌的基础上,还具有良好的生物安全性,满意的力学性能和耐蚀性能。因此,利用含铜

¹中国人民解放军北部战区总医院泌尿外科(沈阳,110016)

²中国科学院金属研究所

通信作者:赵静,E-mail:zhaojing@imr.ac.cn

不锈钢优异的广谱抗菌功能,将其作为一种新型泌尿系统支架材料,旨在减少支架植入后引发的感染问题,是含铜不锈钢生物功能化的新尝试^[7-8]。本文从结石角度出发,对比研究了含铜不锈钢和临床用输尿管支架表面结石形成,并对含铜不锈钢抑制结石形成作用机制进行分析。

1 材料与方 法

1.1 材料制备

在目前临床广泛应用的医用 316L 奥氏体不锈钢成分基础上,添加质量百分数 4%~5% 的铜元素,制备 316L 型含铜不锈钢 4%~4.5%。经挤压、拉拔、磨抛等系列工艺处理后,加工成直径为 1.8 mm,壁厚为 0.1 mm 的薄壁管材,并切割成长度为 10 mm 的小段管材。管材经电解抛光后,清洗备用。以临床中广泛应用的 2 种输尿管支架(A:国产支架,支架材质为聚氨酯;B:进口支架,支架材质为聚亚胺脂复合材料)为对照材料。

1.2 结石沉积实验

将 3 种材料管材垂直放置于离心管中,并加入 10 mL 人工尿液^[9],在 37℃ 恒温箱中进行无机盐沉积实验。在分别沉积 1、2 及 3 个月 后,取出样品,用蒸馏水轻轻清洗。样品自然干燥后利用扫描电镜(SEM)观察表面结石形成情况,同时采用 X 射线光电子能谱(XPS)分析材料表面沉积盐的元素组成。

1.3 铜离子溶出测试

将 316L-Cu 不锈钢管材浸泡于人工尿液中,实验方法参考 GB/T 16886.5—2003,样品表面积/浸泡液体积比例为 3 cm²/mL,恒温 37℃ 浸泡。设置

7 个时间点,每天换液。采用电感耦合等离子体质谱仪检测溶液中铜离子含量。

1.4 抗菌实验

实验选用大肠杆菌(*E. coli*)及金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)。将 3 种材料管材置于 24 孔板中,并按照样品表面积与细菌悬液体积比为 3 cm²/mL 的比例进行共培养。在 37℃ 培养箱中培养 24 h 后,细菌计数。采用下式计算杀菌率。

$$\text{Antibacterial rate \%} = \frac{N_1 - N_2}{N_1} \times 100\%$$

式中, N_1 为阴性活菌数; N_2 为细菌与样品共培养后的活菌数。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件进行分析。每种材料测试 3 个以上样品,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 ANOVA 方法进行整体性差异评价, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结石分布及成分

图 1 为 3 种材料管材在人工尿液中沉积不同时间后的表面形貌。随着沉积时间增加,A 和 B 2 种材料的管材表面均形成了致密的沉积层,且局部形成大尺寸晶体。而 316L-Cu 不锈钢管材沉积初期,表面只黏附了零散的晶体;沉积 3 个月时,表面沉积了多层无机盐,但未形成致密的沉积层,仍有材料基体暴露。对管材表面的晶体进行 XPS 分析可知,主要元素包含 Ca、P 和 O,见图 2。进一步对 Ca 进行分峰处理,可知沉积盐主要成分为钙的磷酸盐,见图 3 及表 1。

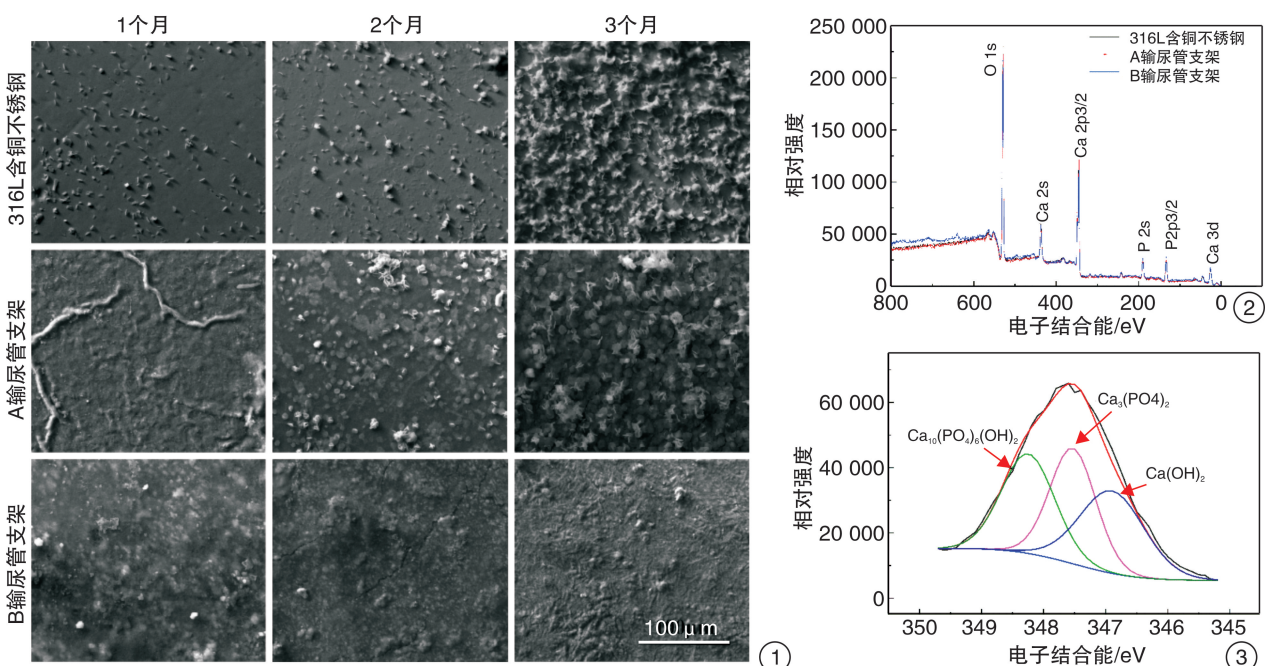


图 1 3 种管材表面沉积盐形貌照片;图 2 不同材料在人工尿液中浸泡 3 个月后的 XPS 扫描谱;图 3 材料表面无机盐中 Ca 元素的 XPS 分析

表 1 材料表面 Ca 的化合物组成

复合物	Ca ₃ (PO ₄) ₂	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	Ca(OH) ₂
百分比	35%	34%	31%

2.2 铜离子溶出

图 4 为 316L-Cu 不锈钢管材在人工尿液中的铜离子溶出曲线。316L-Cu 不锈钢每天的铜离子溶出量相近,约为 8.5 μg/L。

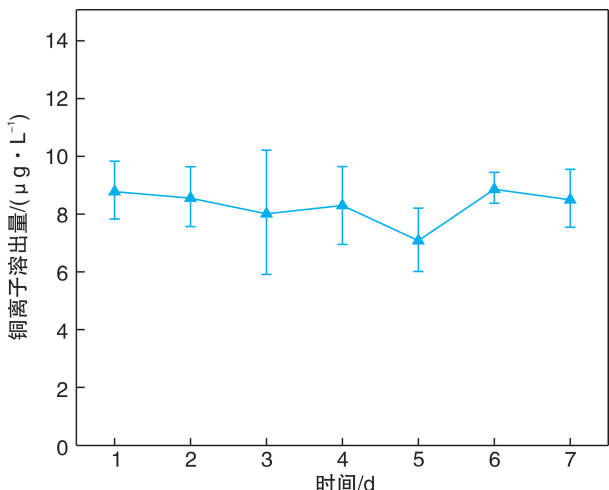
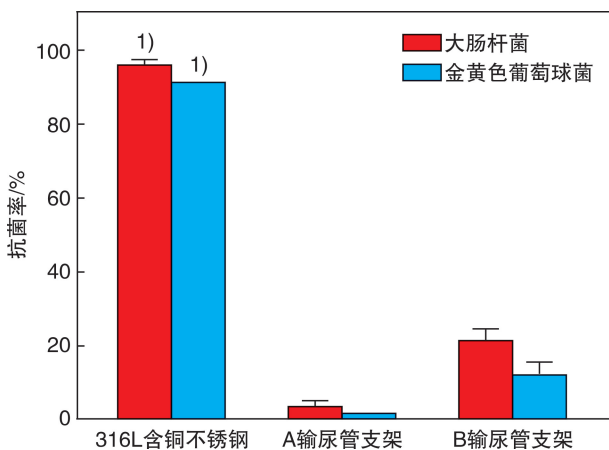


图 4 316L-Cu 不锈钢管材的铜离子溶出曲线

2.3 抗菌率

图 5 为不同材料管材分别与 *E. coli* 和 *S. aureus* 培养 24 h 后的抗菌结果。如图所示,316L-Cu 不锈钢对 *E. coli* 和 *S. aureus* 的杀菌率分别为 95.9%和 91.0%,与 A 和 B 2 种支架比较,差异有统计学意义,展示出良好的抗菌性能。同时,A 支架与 B 支架比较差异有统计学意义,B 支架也具有一定的抗菌功能。



与 A、B 两组比较,¹⁾ P < 0.05。

图 5 不同材料在人工尿液中对 *E. coli* 和 *S. aureus* 的杀灭能力

3 讨论

输尿管支架在临床上应用极为广泛,但其引发的感染、结石等问题也无法避免。相关研究人员试图通过在支架表面上涂覆药物等表面改性方式来解决上述问题^[10-11]。然而,由于植入时产生的摩擦及支架服役时不可避免的洗脱行为,导致涂层失效。因此,选择一种长久恒定的具有抑制感染、结石形成的输尿管支架材料至关重要。Bird 等^[12]对临床患者排出的结石和尿液成分进行分析,发现结石病患者排出尿液中的铜离子含量低于普通人,也就是说铜离子在非结石病患者体内对结石形成有一定的抑制功能。Meyer 等^[13]也发现,铜离子可抑制磷酸钙结石的形成。因此,向材料中添加一定量的铜是一种解决结石问题的可行方法。实际上,在临床中结石与感染并发^[14]。微生物在结石形成过程中发挥着促进作用,它们破坏了人体内抑制细菌黏附的黏多糖,无法调节体内阴离子浓度及构象,并且在静电、亲疏水的共同作用下促使晶体在其表面黏附^[15-16],这种驱动力也加速钙盐的析出,并形成结石,封闭在结石内部的细菌也就无法利用杀菌药物进行杀灭,从而成为感染的源头^[17]。

本文提出将含铜不锈钢通过在普通不锈钢基础上,适量的添加一定含量的铜元素,通过固溶、时效的热处理方式,使铜以富铜相形式在材料中析出,赋予材料抗菌、抑结石的功能。当含铜不锈钢与尿液接触后,随着不锈钢表面均匀腐蚀的进行,不断溶出铜离子,展示出杀灭细菌的功能。由此可推断:输尿管支架植入体内后,尿液中的细菌收到“信号”,向异物积聚,初期少量细菌在其表面聚集,零星分布。随着 316L-Cu 不锈钢与尿液接触时间增加,从材料表面溶出的铜离子含量增加,杀灭表面黏附的细菌同时,还抑制其分泌胞外基质,导致菌落干瘪,附着能力减弱,在尿液冲刷下脱离材料。此时,细菌表面沉积的少量无机盐,也会随着细菌脱离材料表面而脱离。此外,在尿液流动的作用下,铜离子向周围环境扩散,形成抗菌的保护层,将材料与细菌隔离,减少细菌黏附,进而降低形成生物膜的概率。在此作用下,316L-Cu 不锈钢从根本上抑制细菌生物膜在其表面形成,减少尿液中析出的晶体以细菌为核生长,进而长大形成结石的概率。

综上所述,通过对比含铜不锈钢及临床中广泛使用的输尿管支架表面结石形成,发现含铜不锈钢具有一定抑制结石形成的能力。同时,由于其在尿液中不断溶出铜离子,从而具有优异的抗菌功能,进而抑制感染,有望成为一种新型的具有抑结石功能的输尿管支架材料。

[参考文献]

- 1 王锦宁. 导尿管相关尿路感染的预防研究进展[J]. 中国伤残医学, 2013, 21(6): 434-453.
- 2 Wang R, Michele R, Hacker RL. Cost-effectiveness of prophylactic antibiotic use to prevent catheter-associated urinary tract infections[J]. *Int Urogynecol J*, 2020, 31(2): 285-289.
- 3 Venkatesan N, Shroff S, Jeyachandran K, et al. Effect of uropathogens on in vitro encrustation of polyurethane double J ureteral stents[J]. *Urol Res*, 2011, 39(1): 29-37.
- 4 Justin C, Dirk L. Encrustation of Indwelling Urinary Devices[M]. Hoboken, New Jersey, US: John Wiley & Sons Inc, 2017: 215-226.
- 5 Raffaella C, Francesca B, Francesca M, et al. Chitosans as new tools against biofilms formation on the surface of silicone urinary catheters[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 118(Pt B): 2193-2200.
- 6 Ren L, Xu L, Feng J, et al. In vitro study of role of trace amount of Cu release from Cu-bearing stainless steel targeting for reduction of in-stent restenosis[J]. *J Mater Sci-Mater M*, 2012, 23(5): 1235-1245.
- 7 Zhao J, Cao Z, Ren L, et al. A novel ureteral stent material with antibacterial and reducing encrustation properties[J]. *Mat Sci Eng C*, 2016, 68: 221-228.
- 8 Zhao J, Ren L, Zhang B, et al. In vitro study on infectious ureteral encrustation resistance of Cu-bearing stainless steel[J]. *J Mater Sci Technol*, 2017, 12(33): 1604-1609.
- 9 Haddad L. Synthetic urine and method of making same [P]. US, US20040077106 A1, 2006.
- 10 Frant M, Dayyoub E, Bakowsky U, et al. Evaluation of a ureteral catheter coating by means of a Bio-encrustation in vitro model[J]. *Int J Pharm*, 2018, 546(1-2): 86-96.
- 11 Luo Y, Samantha W, Peter AC, et al. Ureteral Stent Technology: Drug-eluting Stents and Stent Coatings [J]. *A J Urol*, 2015, 2(4): 194-201.
- 12 Bird ED, Thomas WC. Effect of Various Metals on Mineralization in vitro[J]. *Exp Biol Med*, 1963, 112(3): 640-643.
- 13 Meyer J, Angino E. The role of trace metals in calcium urolithiasis[J]. *Invest Urol*, 1977, 14(5): 347-350.
- 14 Valentina C, Angelica C, Marco L, et al. Ureteral double-J stents performances toward encrustation after long-term indwelling in a dynamic in vitro model[J]. *J Biomed Mater Res Part B*, 2017, 105(8): 2244-2253.
- 15 Shabeena KS, Rahul B, Muhammed AP, et al. Characteristics of bacterial colonization after indwelling double-J ureteral stents for different time duration[J]. *Urol Ann*, 2018, 10(1): 71-75.
- 16 Verkoelen CF. Crystal retention in renal stone disease: a crucial role for the glycosaminoglycan hyaluronan[J]? *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17(6): 1673-1687.
- 17 Davis NF, Cunnane EM, Quinlan MR, et al. Biomaterials and Regenerative Medicine in Urology [J]. *Cell Biol Trans Med*, 2018, 3: 189-198.

(收稿日期: 2019-11-16)

(上接第 630 页)

- 24 Berghoff AS, Ilhan-Mutlu A, Wohrer A, et al. Prognostic significance of ki67 proliferation index, hif1 alpha index and microvascular density in patients with non-small cell lung cancer brain metastases[J]. *Strahlenther Onkol*, 2014, 190(7): 676-685.
- 25 Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(22): 5830-5835.
- 26 Vasilios E, Andreas C, Kastriotis L, et al. Evaluation of hypoxia-inducible factor 1alpha overexpression as a predictor of tumour recurrence and progression in superficial urothelial bladder carcinoma[J]. *BJU Int*, 2005, 95(3): 425-431.
- 27 Glaspy J, Cavill I. Role of iron in optimizing responses of anemic cancer patients to erythropoietin[J]. *Oncology (Williston Park)*, 1999, 13(4): 461-473.
- 28 Caro JJ, Salas M, Ward A, et al. Anemia as an independent prognostic factor for survival in patients with cancer: A systemic, quantitative review[J]. *Cancer*, 2001, 91(12): 2214-2221.
- 29 张薇, 项永兵, 邵常霞, 等. 吸烟和环境烟草烟雾暴露与膀胱癌关系的病例对照研究[J]. *肿瘤*, 2006, 26(1): 42-47.
- 30 Sue DY, Oren A, Hansen J. Lung function and exercise performance in smoking and nonsmoking asbestos-exposed workers[J]. *Am Rev Respir Dis*, 1986, 132: 612-618.
- 31 王西凤, 邢华. 吸烟对老年 COPD 患者肺功能和气道炎性反应的影响[J]. *疑难病杂志*, 2013, 12(2): 96-98.
- 32 Lukasz P, Pihowicz P, Lukasz K, et al. HIF-1 α expression is inversely associated with tumor stage, grade and microvessel density in urothelial bladder carcinoma. [J]. *Pol J Pathol*, 2018, 69(4): 395-404.
- 33 Deniz H, Karakök M, Yagci F, et al. Evaluation of relationship between HIF-1alpha immunoreactivity and stage, grade, angiogenic profile and proliferative index in bladder urothelial carcinomas. [J]. *Int Urol Nephrol*, 2010(42): 103-107.
- 34 Hunter BA, Eustace A, Irlam JJ, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α predicts benefit from hypoxia modification in invasive bladder cancer. [J]. *Br J Cancer*, 2014, 111(3): 437-443.

(收稿日期: 2019-11-23)